

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-92125

(43) 公開日 平成8年(1996)4月9日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

A 6 1 K 38/27

9/08

47/12

G

J

A 6 1 K 37/ 36

審査請求 未請求 請求項の数16 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号

特願平6-254761

(22) 出願日

平成6年(1994)9月21日

(71) 出願人

000228545

日本ケミカルリサーチ株式会社

兵庫県芦屋市春日町3番19号

(72) 発明者

井上 桂

兵庫県明石市花園町3番地の1

(72) 発明者

辰巳 正史

兵庫県神戸市西区大津和2丁目10番1号

(72) 発明者

幸 義和

兵庫県神戸市西区美賀多4丁目1番2号

(72) 発明者

加藤 和夫

兵庫県神戸市垂水区桃山台6丁目10番3号

(74) 代理人

弁理士 竹内 卓

(54) 【発明の名称】 水性医薬組成物

(57) 【要約】

【目的】 ヒト成長ホルモンの安定な水溶液製剤を提供する。

【構成】 ヒト成長ホルモンを微又は弱酸性水性緩衝液に溶解してなるヒト成長ホルモン含有水性組成物。

【効果】 凍結乾燥せずにそのまま冷所で安定に保存ができ、したがって同時に面倒な溶解操作を必要とせず即時注射することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト成長ホルモンが微又は弱酸性の水性緩衝液中に溶解されてなるヒト成長ホルモン含有水性医薬組成物。

【請求項2】 水性緩衝液のpHが5～7未満である請求項1記載の組成物。

【請求項3】 水性緩衝液のpHが5～6.5、好ましくは5.5～6.5である請求項1記載の組成物。

【請求項4】 水性緩衝液がクエン酸緩衝液である請求項1、2または3記載の組成物。

【請求項5】 エデト酸ナトリウム又は塩化ナトリウムが加えられている請求項1、2、3又は4記載の組成物。

【請求項6】 ヒト成長ホルモンを溶解した水溶液を微又は弱酸性に保つことを特徴とする水溶液中のヒト成長ホルモンの安定化法。

【請求項7】 弱酸性が緩衝剤により保たれる請求項6記載の安定化法。

【請求項8】 弱酸性がpH5～7未満である請求項6又は7記載の安定化法。

【請求項9】 弱酸性がpH5～6.5、好ましくは5.5～6.5である請求項6又は7記載の安定化法。

【請求項10】 緩衝剤がクエン酸緩衝剤である請求項7記載の安定化法。

【請求項11】 水溶液中にエデト酸ナトリウム又は塩化ナトリウムが加えられる請求項7記載の安定化法。

【請求項12】 ヒト成長ホルモンを弱酸性緩衝液に溶解することを特徴とする安定なヒト成長ホルモン水溶液の製造法。

【請求項13】 弱酸性がpH5～6.5である請求項12記載の製造法。

【請求項14】 弱酸性がpH5.5～6.5である請求項12記載の製造法。

【請求項15】 緩衝液がクエン酸緩衝液である請求項12記載の製造法。

【請求項16】 緩衝液にエデト酸ナトリウム又は塩化ナトリウムが加えられる請求項12記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、骨端線閉鎖を伴わない下垂体性小人症などの低身長の子供に対する治療剤として用いられているヒト成長ホルモンの水溶液の形における製剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ヒト成長ホルモン（略称hGH）は191個のアミノ酸残基よりなる一本鎖のポリペプチドホルモンである。hGHは通常単量体として存在し生物活性を有するが、熱や振とうなどのストレスにさらされると、hGH分子間の相互作用により二量体、さらに多量体へと重合して生物活性が低下していくことが知られて

いる（Becker, G. W, et al. (1987) Biotechnol. Appl. Biochem., 9, 478）。また、hGHを水溶液中で長期間保存するとhGHの分子の重合体の生成は少ないが、分子内のアミド結合が一部分加水分解された生成物（以下、脱アミド体と略称する）が徐々に生成することが知られている。この脱アミド体にはhGHとしての生物活性の変化が見られない（Becker, G. W, et al. (1988) Biotechnol. Appl. Biochem., 10, 326）ものの品質面の変化を起こしているとの観点からその含量規格値が一般に設定されている。また、hGHが酸化されて生成するスルホキシド体が希に検出される場合もある。

【0003】hGHの品質、特に二量体や多量体と単量体並びに脱アミド体含量の測定には以下の2つの高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による方法が一般に用いられている。サイズ排除HPLC（SE-HPLC）はhGHの単量体、二量体および多量体を分離定量する方法であり、逆相HPLC（RP-HPLC）はhGHおよび脱アミド体或いはスルホキシド体を分離定量する方法である。特にhGHのサイズ排除HPLCで求めた単量体のピーク面積と生物活性の間には相関が認められ、生物活性が既知の標準品を用いることによりhGHの生物検定に代わる理化学的含量測定法として適正であることが認められている（幸ら（1994）医薬品研究25、383）。このことはこの2つのHPLCでhGHを評価すれば、単に単量体、脱アミド体の評価だけでなくhGHの活性も確認できることを示している。

【0004】hGHは骨端線閉鎖を伴わない下垂体性小人症などの低身長の子供患者に対する治療剤として既に広く利用されている。当初は、ヒトの下垂体から抽出したhGHを製剤化していたが、供給量や安全性などの観点から現在では、遺伝子組換え技術により高純度に精製され、しかも大量生産することができるようになった遺伝子組換えヒト成長ホルモン（r-hGH）がとって変わってきた。hGHを製剤化して患者に提供するためには、製造してからある程度の長期間に亘ってhGHの活性が保持されなければ安心して治療に供することはできない。従来の製剤の組成では前述したようにhGHの品質面の維持から水溶液状態で長期間保存することから困難であるため、凍結乾燥した製剤が供給され、使用時に添付された溶解液で溶解して治療に用いられている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】ヒト成長ホルモンの凍結乾燥製剤を低身長の改善に実際に使用する際は、患者自身或いは医療施設において添付の溶解液で製剤を溶かして後、皮下或いは筋肉に注射する。その治療は年単位の長期に亘るため、投与開始の初期段階を経た後、在宅での自家注射が行われている。従って、凍結乾燥製剤の溶解を患者或いはその家族が行うことになるため、hG

Hの生物活性を低下させる重合体の生成が起こらないように、医師が溶解方法を十分説明するとともに、hGHの添付溶解液での溶解に当たって、注意事項として静かに円を描くように回して溶解することを明記しているのが一般的である。

【0006】また、重合体の生成はそれ以前の凍結乾燥製剤を製造する際にも見られるため、その重合体の生成を抑える組成も見いだされてきているが、更に使い勝手の良い安定な製剤の開発への要望は切実である。最近、自家注射との観点から、注射筒と連動したキット製剤が使用されてきているが、hGHの凍結乾燥物の溶解を一つの注射筒内で行う必要から複雑な構造になっているので操作が煩雑であり、しかも患者及びその家族への説明を十二分に必要がある。

【0007】また、前記のようにhGHを中性の溶液状態、例えばリン酸塩緩衝液などの溶液中で保存していると徐々に脱アミド体が生成するが、その生成を防止する手段は現在まで知られていない。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らはより安定なhGHの新しい凍結乾燥製剤の処方を検討していく過程で、偶然にも凍結前のhGH調製液を保存していたところ、中でもクエン酸ナトリウム緩衝液のpH6に含有さ*

本発明の検討に用いた医薬品添加物

*れたhGH調製液は安定で、二量体及び重合体の生成を起こさず、更に脱アミド体の生成もない事実遭遇したことが本発明の端緒になった。

【0009】本発明者らは、この発見について更に精査するため、従来の凍結乾燥製剤で用いられている中性付近における50mMリン酸塩緩衝液(pH7.4)中に表1に掲げる各医薬品添加物をそれぞれ記載の量で加えた時の単量体含量並びに脱アミド体含量の測定を行った。実験は各医薬品添加物を含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)10mlにhGH水溶液(3.0mg/ml)10mlを加え攪拌し、孔径0.22μmのフィルターに通した後、各溶液を10ml容のバイアルに1mlずつ分注、密栓して試料とした。なお、hGHの脱アミド体は保存温度を上げることにより増加することが知られているので、試料を恒温器中40℃の加速条件下で保存し、0, 3, 7, 14, 21, 28日後に開栓し、その内50μlずつをHPLC分析に供した。結果は加えたいずれの添加物の場合も単量体含量では大差なく、しかも脱アミド体生成における抑制効果はほとんど認められなかった。

【0010】

【表1】

| 医 薬 品 添 加 物 | 添加量 (mg/ml) | 医 薬 品 添 加 物 | 添加量 (mg/ml) |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| アミノ酢酸 | 20 | アスコルビン酸 | 5 |
| 安息香酸ナトリウム | 10 | 亜硫酸水素ナトリウム | 20 |
| 塩化ナトリウム | 20 | エデト酸ナトリウム | 20 |
| 塩酸アルギニン | 10 | 塩化ベンザルコニウム | 0.5 |
| クエン酸ナトリウム | 20 | 乾燥亜硫酸ナトリウム | 20 |
| グルタミン酸ナトリウム | 20 | 乾燥炭酸ナトリウム | 10 |
| クレアチニン | 7 | グリセリン | 20 |
| 酢酸ナトリウム | 7 | 炭酸水素ナトリウム | 20 |
| サリチル酸ナトリウム | 20 | ピロ亜硫酸ナトリウム | 20 |
| ゼラチン | 1 | プロピレングリコール | 0.2 |
| D-ソルビトール | 20 | ベンジルアルコール | 9 |
| チオ硫酸ナトリウム | 2 | ポリソルベート80 | 1 |
| ニコチン酸アミド | 20 | 無水エタノール | 10 |
| 乳糖 | 20 | メタスルホ安息香酸ナトリウム | 0.1 |
| フェノール | 1 | メタクレゾール | 3 |
| ブドウ糖 | 20 | アルファチオグリセリン | 10 |
| ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60 | 20 | チオグリコール酸ナトリウム | 10 |
| マクロゴール4000 | 1 | D,L-メチオニン | 0.5 |
| D-マンニトール | 20 | | |

【0011】そこで、本発明の契機となった微酸性又は弱酸性の緩衝液であるクエン酸緩衝液(pH5.1~6.9)中での各医薬品添加物を加えて検討したところ、hGHを含有する緩衝液のpHを低下させることにより、脱アミド体の生成が防止できることが判明した。

【0012】本発明はこれらの知見に基づくもので、ヒ

ト成長ホルモンが微又は弱酸性の水性緩衝液中に溶解されてなるヒト成長ホルモン含有水性医薬組成物、ヒト成長ホルモンを溶解した水溶液を微又は弱酸性に保つことを特徴とする水溶液中のヒト成長ホルモンの安定化法、およびヒト成長ホルモンを微又は弱酸性の水性緩衝液に溶解することを特徴とする安定なヒト成長ホルモン水溶

液の製造法に関する。

【0013】本発明において使用されるhGHは191個のアミノ酸からなる天然型遺伝子組換えヒト成長ホルモンでもよく、下垂体抽出によるヒト成長ホルモンでもよい。

【0014】水性緩衝液としてはpHを7未満、好ましくは6.5以下の微または弱酸性に調整でき、例えばhGHの沈殿の生じないpHの下限を構成でき、注射用として許容されうるものであればいずれでもよい。

【0015】緩衝液はpH5~7未満、好ましくは5~6.5、さらに好ましくは5.5~6.5の範囲で緩衝効果のあるものが望ましい。その例としてはクエン酸緩衝液、コハク酸緩衝液などが挙げられ、クエン酸緩衝液が特に好ましい。その緩衝液における緩衝剤の濃度は特に限定されるものではなく、pHが5.0~7未満に調整できる量であって緩衝能を保持できる濃度であればいずれでも良い。通常は5~100mMが望ましい。

【0016】本発明のヒト成長ホルモン含有水性医薬組成物または安定なヒト成長ホルモン水溶液はヒト成長ホルモンを上記の水性緩衝液に溶解することにより得られ、またそれによってヒト成長ホルモンを溶解した水溶液は微又は弱酸性に保たれ水溶液中のヒト成長ホルモンが安定化される。

【0017】本発明のヒト成長ホルモン含有水性医薬組成物又はヒト成長ホルモン水溶液中に溶解させる該ホルモンの量は特に限定されるものではなく、上限量としては緩衝液中で溶解されうる量であれば良く、また下限量としては広く一般的に用いられる量であればいずれでも構わないが、一般的に利用される製剤含量である1ml中に1~10mgの範囲のhGHが含有されるように溶解するのが好ましい。

【0018】ヒト成長ホルモンの保存期間中にスルホキシド体の生成を確認することが時にはある。発明者らはこのスルホキシド体の生成も抑制することができないかとの観点にたち、クエン酸緩衝液中でのhGHにエデト酸ナトリウム、塩化ナトリウムなどを添加して検討したところ、エデト酸ナトリウムがhGHの酸化(スルホキシド体生成)を防止する可能性が見出された。更にヒト成長ホルモンのクエン酸緩衝液製剤にベンジルアルコー

ル等の防腐剤を添加しても本発明のヒト成長ホルモンの品質に影響を与えないことを実証した。したがって、本発明の組成物をベンジルアルコールを含有するヒト成長ホルモンの水溶液製剤として提供することも可能である。

【0019】本発明によるヒト成長ホルモンの水溶液製剤の安定性を種々の面から精査したところ、4℃で40日間保存したときのhGHのHPLC分析結果では、いずれの場合においても主ピーク(単量体含量)は90%以上であり、脱アミド体の生成がこの条件下で抑制されていることが分かった(表2)。脱アミド体が単純な一次反応で生成すると仮定し、4℃と40℃に保存したときの表2の結果を基に計算すると、4℃、pH5.5~6.5の条件で保存したとき、少なくとも一年間は脱アミド体含量を12%以下に抑制でき、従来の凍結乾燥製剤とほぼ同様の結果が得られる製剤であることが確認され、また単量体についても4℃で一年間保存しても98%以上の高い含量が保持されることが分かった。このことから、本発明のヒト成長ホルモン含有水性組成物又は水溶液は従来のように凍結乾燥をすることなく、冷所保存で十分に使用可能であることが判る。その保存は冷所で、好ましくは2~8℃において行うのが望ましい。

【0020】以下に実施例を挙げて本発明をさらに説明する。

【0021】実施例1. 40mg/mlの医薬品添加物(エデト酸ナトリウム、または塩化ナトリウム)を含む40mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH5.1~7.0)または対照として40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0~7.7)10mlにhGH水溶液(3.0mg/ml)10mlを加え攪拌し、孔径0.22μmのフィルターに通した後、各溶液を10ml容のバイアルに1mlずつ分注、密栓して検体とした。これらを恒温器中40℃、または4℃で保存し、0, 3, 7, 14, 21, 28, 40日後に開栓し、内容液をRP-HPLCおよびSE-HPLCにより分析した結果を表2に示す。

【0022】

【表2】

分析結果1

| 医薬品 添加物 | 緩衝液 | pH | SE-HPLC単量体 (%) | | | | | | | | RP-HPLC主ピーク (%) | | | | | | | |
|--------------|------|-----|----------------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------|------|------|------|------|------|-----|----|
| | | | 0日 | 40℃ | | | | | | 4℃ | 0日 | 40℃ | | | | | | 4℃ |
| | | | | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 | 40日 | | | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 | 40日 | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| なし | クエン酸 | 5.1 | 99.1 | 99.2 | 99.3 | 99.3 | <100 | 99.1 | 99.1 | 98.8 | 94.3 | 87.9 | 80.2 | 72.2 | 67.1 | 97.5 | | |
| | | 5.6 | 98.5 | 98.8 | 99.0 | 99.0 | 99.1 | 99.2 | 98.4 | 98.2 | 93.1 | 86.8 | 77.2 | 63.8 | 53.6 | 97.2 | | |
| | | 6.1 | 98.0 | 98.4 | 98.3 | 98.9 | 99.0 | 99.0 | 98.5 | 98.2 | 90.3 | 78.7 | 65.8 | 46.7 | 34.8 | 97.0 | | |
| | | 6.6 | <100 | 98.5 | <100 | 98.6 | 98.9 | 98.8 | 98.6 | 97.9 | 86.8 | 71.7 | 51.2 | 33.7 | 20.8 | 96.7 | | |
| | | 6.9 | 98.2 | 98.6 | 98.6 | 98.5 | 98.8 | 98.7 | 98.6 | 98.2 | 84.5 | 68.4 | 43.8 | 25.9 | 11.2 | 96.3 | | |
| | リン酸 | 7.0 | 98.2 | 98.5 | 98.5 | 98.7 | 98.7 | 98.5 | 98.6 | 98.1 | 80.8 | 64.2 | 29.3 | 17.2 | 5.97 | 95.5 | | |
| | | 7.5 | 98.2 | 98.4 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.3 | 98.6 | 97.7 | 75.4 | 49.6 | 15.8 | 6.73 | n.d. | 93.6 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| エド酸 ナトリウム | クエン酸 | 5.1 | 98.5 | 98.9 | 99.0 | 99.0 | 99.1 | 98.8 | 98.5 | 98.3 | 94.9 | 89.9 | 82.8 | 83.4 | 69.6 | 97.6 | | |
| | | 5.6 | 98.1 | 98.5 | 98.7 | 99.0 | 99.0 | 99.0 | 98.4 | 98.3 | 94.9 | 89.2 | 80.7 | 71.4 | 60.1 | 97.5 | | |
| | | 6.1 | 98.1 | 98.1 | 98.3 | 98.5 | 98.4 | 98.7 | 98.6 | 98.8 | 92.8 | 84.0 | 71.9 | 56.2 | 44.7 | 97.4 | | |
| | | 6.7 | 98.1 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.5 | 98.3 | 98.6 | 98.8 | 87.4 | 75.7 | 53.3 | 37.3 | 22.4 | 97.0 | | |
| | リン酸 | 7.0 | 98.1 | 98.4 | 98.6 | 98.7 | 98.7 | 98.2 | 98.6 | 98.5 | 80.6 | 59.6 | 29.4 | 18.4 | <18 | 95.5 | | |
| | | 7.5 | 98.3 | 98.6 | 98.4 | 98.2 | 97.6 | 97.0 | 98.6 | 97.0 | 71.5 | 44.6 | 11.8 | 7.07 | n.d. | 92.8 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

n. d. : 測定不能

【0023】RP-HPLCにおける主ピークとは化学的な修飾を受けてない未分解のhGHを指し、その他のピークは脱アミド体などを指す。したがって、主ピークの割合が高いほどhGHの脱アミド体への変換が抑えられていることを表す。表2より、経時的に主ピークの割合は減少していくが、pHが低いほど主ピークの割合が高い。すなわち、hGHの脱アミド体生成が抑えられていることが明らかである。

【0024】SE-HPLCにおける単量体以外のピークは二量体および単量体を含む。hGHの単量体は生物活性を十分有しているが、二量体以上の多量体を形成すると生物活性が低くなることが知られている。したがって、単量体のピークの割合が高く保たれることが望ましい。表2より、単量体のピークの割合は、経時的にほとんど変化しないとともに、pHにもほとんど依存していないことがうかがわれる。すなわち、pH5.5～7.

5の範囲内において、hGHは40℃、28日間の加速条件下でも単量体のまま保たれることが示された。

【0025】次に添加物の効果を精査した。エド酸ナトリウム及び塩化ナトリウムは、表1に掲げた各種添加剤を添加した試験において、若干好ましい結果が得られた添加物である。同じpHにおける添加剤の有無で比較すると、エド酸ナトリウム或いは塩化ナトリウムを添加した方が脱アミド体生成の抑制効果が多少見られる(表2及び表3)。一方、単量体含量に関しては、いずれの場合においても98%以上の高い割合が保持されていた(表2及び表3)。これらの結果より、エド酸ナトリウムおよび塩化ナトリウムはhGHの安定化剤として添加できるものと考えられる。

【0026】

【表3】

分析結果1(続)

| 医薬品 添加物 | 緩衝液 | pH | SE-HPLC単量体(%) | | | | | | | RP-HPLC主ピーク(%) | | | | | | |
|-------------|------|-----|---------------|------|------|------|------|------|------|----------------|------|------|------|------|------|------|
| | | | 40℃ | | | | | | 4℃ | 40℃ | | | | | | 4℃ |
| | | | 0日 | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 | 40日 | 0日 | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 | 40日 |
| 塩化 ナトリウム | クエン酸 | 5.1 | 98.5 | 98.9 | 99.2 | 99.0 | <100 | 98.8 | 98.6 | 98.2 | 95.7 | 91.3 | 85.5 | 85.3 | 72.5 | 97.1 |
| | | 5.7 | 98.2 | 98.3 | 98.7 | 98.6 | <100 | 98.9 | 98.6 | 98.6 | 93.9 | 88.2 | 79.9 | 65.1 | 56.5 | 97.5 |
| | | 6.3 | 98.1 | 98.5 | 98.8 | 98.3 | <100 | 98.8 | 98.6 | 98.7 | 90.4 | 80.7 | 64.9 | 45.3 | 33.0 | 97.3 |
| | | 7.0 | 98.3 | 98.6 | 98.8 | 98.4 | 98.9 | 98.5 | 98.6 | 97.6 | 85.7 | 71.6 | 43.5 | 28.0 | 11.1 | 96.2 |
| | リン酸 | 7.1 | 98.2 | 98.7 | 98.9 | 98.5 | 98.8 | 98.7 | 98.6 | 98.4 | 79.8 | 55.8 | 29.0 | <29 | 4.86 | 95.2 |
| | | 7.7 | 98.2 | 98.7 | 98.8 | 98.3 | 98.5 | 98.1 | 98.5 | 97.1 | 71.6 | 42.9 | 16.2 | 5.86 | n.d. | 92.9 |

n.d. : 測定不能

【0027】実施例2. pHを5.0および5.5に調製した40mMクエン酸ナトリウム緩衝液、または40mMコハク酸ナトリウム緩衝液10mlにhGH水溶液(3.0mg/ml)10mlを加え攪拌し、孔径0.22μmのフィルターに通した後、各溶液を10ml容のバイアルに1mlずつ分注、密栓して試料とした。試*20

分析結果2

| 医薬品添加物 | 緩衝液 | pH | SE-HPLC単量体(%) | | | | | | RP-HPLC主ピーク(%) | | | | | |
|--------|------|-----|---------------|------|------|------|------|------|----------------|------|------|------|------|------|
| | | | 0日 | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 | 0日 | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 |
| なし | クエン酸 | 5.1 | 99.2 | <100 | 99.5 | 99.3 | 99.1 | 98.9 | 99.3 | 95.7 | 94.8 | 85.8 | 69.6 | 57.6 |
| | | 5.6 | 98.7 | 99.0 | 99.2 | 99.2 | 99.0 | 98.6 | 99.2 | 93.3 | 87.5 | 75.9 | 64.5 | 50.9 |
| | コハク酸 | 5.0 | 99.1 | 99.3 | 99.3 | 99.7 | 99.6 | 99.3 | 99.2 | 95.9 | 96.2 | 83.5 | 70.5 | 62.1 |
| | | 5.6 | 98.7 | 99.0 | 99.2 | 99.2 | 99.0 | 98.7 | 99.2 | 93.7 | 88.6 | 76.9 | 62.5 | 53.8 |

【0029】表4からhGHの脱アミド体生成を抑制するためには、クエン酸ナトリウム緩衝液の代わりにコハク酸ナトリウム緩衝液を用いてもよいことが明らかである。また緩衝液の種類に関わらず、hGH単量体のピークの割合は経時的にほとんど変化せず一定である。

【0030】実施例3. 1.8%ベンジルアルコールを含む40mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH5.1~6.2)または40mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)10mlにhGH水溶液(3.0mg/ml)10mlを加え攪拌し、孔径0.22μmのフィルターに通した後、各溶液を10ml容のバイアルに1mlずつ分注、密栓して試料とした。試料を恒温器中40℃で保存し、0、3、7、14、21、28日後に開栓し、内容をRP-HPLCおよびSE-HPLCにより分析した。その結果を表5に示す。ベンジルアルコールは

*料を恒温器中40℃で保存し、0、3、7、14、21、28日後に開栓し、内容をRP-HPLCおよびSE-HPLCにより分析した。結果を表4に示す。

【0028】

【表4】

防腐剤として添加してみた。ベンジルアルコールの有無で比較した場合、pH5.1およびpH5.6においてはベンジルアルコールを添加すると単量体含量が若干低くなる(28日目で約96%)が、pH6.2およびpH7.4においてはベンジルアルコールの有無に関わらず単量体は高い含量(98%以上)で保持されていた。一方、脱アミド体含量に関しては、ベンジルアルコールの有無に関わらずほぼ同様な結果が得られた。したがって、pH6.2~7.4の条件下において、防腐剤としてのベンジルアルコールの添加によってもhGHの安定性が損なわれることはなく、必要に応じて添加することも可能であると考えられる。

【0031】

【表5】

分析結果3

| 医薬品添加物 | 緩衝液 | pH | SE-HPLC単量体(%) | | | | | | RP-HPLC主ピーク(%) | | | | | |
|--------------------|------|-----|---------------|------|------|------|------|------|----------------|------|------|------|------|------|
| | | | 0日 | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 | 0日 | 3日 | 7日 | 14日 | 21日 | 28日 |
| なし | クエン酸 | 5.1 | 99.2 | <100 | 99.5 | 99.3 | 99.1 | 98.9 | 99.3 | 95.7 | 94.8 | 85.8 | 69.6 | 57.6 |
| | | 5.6 | 98.7 | 99.0 | 99.2 | 99.2 | 99.0 | 98.6 | 99.2 | 93.3 | 87.5 | 75.9 | 64.5 | 50.9 |
| | | 6.2 | 98.1 | 98.5 | 99.0 | 99.0 | 99.0 | 98.3 | 99.2 | 92.4 | 80.4 | 62.2 | 46.7 | 34.5 |
| | リン酸 | 7.4 | 98.6 | <100 | 98.5 | 98.3 | 98.2 | <100 | 98.8 | 76.2 | 49.7 | 21.4 | 9.80 | <9.8 |
| ベンゾアルコール (0.9%) | クエン酸 | 5.1 | <100 | 98.8 | 98.4 | 97.7 | 97.0 | 96.4 | 99.3 | 97.7 | 94.5 | 83.1 | 72.1 | 59.4 |
| | | 5.6 | 98.9 | 99.1 | 98.7 | 97.9 | 97.0 | 96.2 | 99.2 | 93.1 | 86.9 | 74.3 | 62.8 | 51.9 |
| | | 6.2 | 98.2 | 98.9 | 99.0 | 98.9 | 98.7 | 98.1 | 99.1 | 92.0 | 80.4 | 62.1 | 45.8 | 34.3 |
| | リン酸 | 7.4 | 98.6 | 98.5 | 98.2 | 98.5 | 98.2 | <100 | 97.3 | 74.1 | 53.6 | 20.6 | 4.62 | <4.6 |

【0032】（実施例における各種HPLCによる測定方法）サイズ排除HPLC及び逆相HPLCは幸らの方法（医薬品研究25、383（1994））に準じて、下記のカラムおよび条件に従って行った。

1. サイズ排除HPLC（SE-HPLC）：

カラム：TSK gel G3000SW_{XL}（7.8mm×30cm）

溶出液：0.2Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH6.5）、0.1M塩化ナトリウム

流速：0.6ml/min

カラム温度：室温

検出波長：280nm

2. 逆相HPLC（RP-HPLC）：

カラム：Vydac 214TP54（4.6mm×25cm）

溶出液：50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）：n-プロパノール=71：29

20 流速：0.5ml/min

カラム温度：45℃

検出波長：280nm

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、凍結乾燥や用時の慎重な溶解操作などを必要とせず、水溶液として保存し、そのまま注射できるヒト成長ホルモンの安定な水性製剤が提供される。

THIS PAGE BLANK (USPTO)